Dosage de (1→3)-β-D-Glucane sérique

FUNGITELL®

Mode d'emploi

ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Téléphone : +1 508 540-3444
Numéro gratuit : +1 888 395-2221
Fax : +1 508 540-8680
Assistance technique : +1 800 848-3248
Service client : +1 800 525-8378

PN001268-fr Rev 1
Révisé en février 2011

USAGE PRÉVU

Le dosage Fungitell est un dosage colorimétrique basé sur la réaction protéase – zymogène pour la détection qualitative de (1→3)-β-D-Glucane dans le sérum de patients présentant des symptômes ou des conditions médicales prédisposant les patients à une infection fongique invasive. La concentration sérique de (1→3)-β-D-Glucane, composant majeur de la paroi cellulaire de différents champignons médicalement importants (1), peut faciliter le diagnostic de mycoses profondes et fongémies (2). Un résultat positif n'indique pas quelle classe de champignon peut provoquer l'infection.

Fungitell doit être utilisé en association avec d'autres méthodes diagnostiques comme une culture microbiologique, un examen histologique d'échantillons biopsiques et un examen radiologique.

Important - il est recommandé de fournir les informations suivantes au médecin prescripteur :

Le dosage Fungitell ne détecte pas certaines espèces fongiques comme l'espèce *Cryptococcus* qui produit de très faibles taux de (1→3)-β-D-Glucan (3,4). Le dosage ne détecte pas les zygomycètes comme *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus* (1,4) qui ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-Glucane. En outre, la phase de levure du *Blastomyces dermatitidis* produit peu de (1→3)-β-D-Glucane et peut ne pas être détectée par le dosage (5).

Cette mention doit figurer dans les résultats des tests du Dosage du Glucane.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

On observe une incidence accrue des infections fongiques par des pathogènes opportunistes, en particulier chez les patients présentant un déficit immunitaire (6,7,8). Les maladies fongiques invasives, comme les infections opportunistes, sont courantes parmi les affections hématologiques malignes et chez les patients ateints du SIDA, et représentent un nombre croissant d'infections nosocomiales, en particulier chez les patients transplantés et ceux recevant des traitements immunosuppresseurs (9,10). De nombreuses maladies fongiques sont acquises par inhalation de spores fongiques du sol, de détritus de plantes, de systèmes de traitement de l'air et/ou de surfaces exposées. Certains champignons opportunistes sont présents dans/sur la peau humaine, le tractus intestinal et les muqueuses (11,12). Le diagnostic des mycoses invasives et des fongémies est généralement basé sur des techniques diagnostiques ou radiologiques non spécifiques. Récemment, les marqueurs biologiques de l'infection fongique ont été ajoutés aux méthodes de diagnostic disponibles (2).

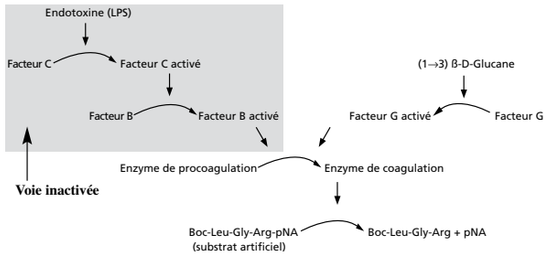
Les pathogènes fongiques opportunistes incluent *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* et *Pneumocystis jirovecii*. Le (1→3)-β-D-Glucane produit par ces organismes et d'autres peut être détecté par le dosage Fungitell (1,8,13).

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le dosage Fungitell mesure les taux de (1→3)-β-D-Glucane. Le dosage est basé sur une modification du mécanisme du lysat d'amoebocyte de limule (*Lymulus* Amebocyte Lysate, LAL) (14,15,16,17), Figure 1. Le réactif Fungitell est modifié pour éliminer le Facteur C et ainsi ne réagir qu'au (1→3)-β-D-Glucane, par la voie du Facteur G de ce mécanisme.

(1→3)-β-D-Glucane active le facteur G, un zymogène à sérine protéase. Le Facteur G activé convertit l'enzyme inactif de procoagulation en enzyme de coagulation actif qui coupe la protéine pNA du substrat peptidique chromogénique, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, créant un chromophore qui absorbe à 405 nm. Le dosage cinétique Fungitell, décrit ci-dessous, est basé sur la détermination de l'augmentation du taux de densité optique produite par un échantillon. Ce taux est interprété au regard d'une courbe standard pour donner des estimations de la concentration de (1→3)-β-D-Glucane dans l'échantillon.

FIGURE 1
Mécanisme du lysat d'amoebocyte de *limule*



MATÉRIEL FOURNI AVEC LE KIT FUNGITELL

Le kit Fungitell est à usage diagnostique *in vitro*. Le matériel suivant fourni avec chaque kit est suffisant pour doser 110 puits sur deux plaques de microtitration (55 puits chacune) :

1. Réactif Fungitell®, LAL spécifique (1→3)-β-D-Glucane lyophilisé (deux flacons)
2. Tampon de reconstitution au Pyrosol®, Tris HCl 0,2 *M* pH 7,4 (deux flacons). Des flacons supplémentaires de tampon de reconstitution au Pyrosol (numéro de catalogue BC051) peuvent être achetés séparément.
3. Glucan standard, pachyman lyophilisé et complément inerte avec la teneur en (1→3)-β-D-Glucane stipulée sur l'étiquette (deux flacons)
4. Eau pure pour analyse (EPA) (deux flacons)
5. Pyroplates : microplaques non enduites de 96 puits à fond plat avec couvercles, sans interférence de Glucanes (deux)
6. KCl 1,2 *M* (un flacon)
7. KOH 0,25 *M* (un flacon)

Tout le matériel ci-dessus, à l'exception du standard, ne présente pas de taux de (1→3)-β-D-Glucane pouvant interférer avec le dosage.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE (NON FOURNI)

Tout le matériel doit être exempt de taux de Glucane pouvant interférer avec le dosage. Le matériel en verre doit être dépyrogéné par chaleur sèche à au moins 235° C pendant 7 heures (ou un équivalent validé) pour être considéré convenir à l'emploi.

1. Embouts de pipette* (250 µl – Réf. PPT25, 1000 µl – Réf. PPT10)
2. Pipeteurs capables de délivrer des volumes de 5-25 µl et 100-1000 µl
3. Pipette à répétition, avec embouts de seringue, capable de délivrer 100 µl
4. Tubes à essai* pour la préparation de la gamme d'étalonnage et les mélanges réactionnels du traitement du sérum. (13 x 100 mm verre de borosilicate – Réf. TB013)
5. Lecteur de plaques thermostaté (37° C) capable de fonctionner à deux longueurs d'onde, 405 et 490 nm, ayant une plage dynamique d'au moins 2,0 unités d'absorbance, associé à un ordinateur exécutant un logiciel de dosage cinétique approprié.
6. Tubes stériles sans glucane à bouchon à vis pour aliquoter les échantillons (la plupart des tubes certifiés sans ARNase, ADNase et pyrogène sont exempts de taux de (1→3)-β-D-Glucane pouvant interférer avec le dosage.
7. Parafilm®

* Ces produits, fournis par Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), sont certifiés sans interférence avec le dosage des Glucanes.

Attention : les pipettes avec bouchons en coton sont des sources potentielles de contamination au Glucane.

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

***Ce produit est réservé au DIAGNOSTIC* IN VITRO**

Le dosage Fungitell requiert une attention rigoureuse à la technique et à l'environnement de test. Une formation approfondie du technicien à la méthode de dosage et à la prévention de la contamination est essentielle pour l'efficacité du dosage

1. Certaines espèces fongiques produisent de très faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane et ne sont généralement pas détectées par le dosage Fungitell. Celles-ci incluent le genre *Cryptococcus* (3,4) ainsi que les zygomycètes comme *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus* (1,4). En outre, *Blastomyces dermatitidis*, dans sa forme levure, produit de faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane et n'est donc généralement pas détecté par le dosage Fungitell (5).
2. Ne pas pipeter une substance avec la bouche. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones de manipulation des spécimens ou des réactifs du kit.
3. Établir un environnement propre dans lequel effectuer le dosage. Utiliser des matériels et réactifs certifiés sans interférence avec les taux de (1→3)-β-D-Glucane. Noter que le Glucane ainsi qu'une contamination fongique en provenance du corps humain, de vêtements, de récipients, de poussières aériennes ou aquatiques peut provoquer une interférence avec le dosage Fungitell.
4. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
5. Des échantillons décolorés ou troubles comme ceux grossièrement hémolysés, lipémiques ou contenant trop de bilirubine peuvent provoquer des interférences. Si de tels échantillons sont dosés, les résultats doivent être analysés en recherchant une preuve d'interférence optique et/ou des schéma cinétiques inhabituels.
6. Utiliser des vêtements de protection appropriés et des gants sans talc lors de la manipulation des prélèvements de patients.
7. Le sérum des patients hémodialysés peuvent contenir des taux de (1→3)-β-D-Glucane. élevés lorsque certaines membranes de dialyse en cellulose sont utilisées (18,19). L'hémodialyse avec des membranes en triacétate de cellulose ou des membranes en méthacrylate de polyméthyl ne semble pas affecter le dosage.
8. Les gazes et éponges chirurgicales peuvent provoquer une libération de taux élevés (1→3)-β-D-Glucane susceptibles de contribuer à un résultat positif transitoire d'une contamination pour le dosage Fungitell comme cela a été observé chez des patients post-chirurgicaux (20,21).
9. Les kits dont le contenu est endommagé ne doivent pas être utilisés.
10. Les matériels exposés à des liquides potentiellement contaminés (contenant des pathogènes) doivent être éliminés en conformité avec la réglementation locale.

Conservation des réactifs

Conserver tous les réactifs, tels que fournis, à l'abri de la lumière, entre 2 et 8 °C. Le réactif Fungitell reconstitué doit être conservé entre 2 et 8 °C et utilisé dans les 2 heures. Par ailleurs, le réactif Fungitell reconstitué peut être congelé à -20 °C pendant 20 jours puis décongelé une seule fois avant utilisation.

Manipulation des spécimens

1. Collecte des spécimens : les échantillons de sérum doivent être collectés dans des tubes à vide stériles (bouchons rouges) ou des tubes séparateurs de sérum (SST), et laissés coaguler. Le sérum est alors séparé du caillot et décanté dans un récipient approprié sans taux de (1→3)-β-D-Glucane pouvant interférer avec le dosage.
2. Conservation des spécimens : les échantillons de sérum peuvent être conservés entre 2 et 8 °C avant dosage ou à -20 °C ou une température plus froide. Le test doit être effectué rapidement pour éviter une dégradation possible de l'échantillon.
3. Étiquetage des spécimens : les spécimens doivent être clairement étiquetés conformément aux pratiques approuvées de l'établissement.

PROCÉDURE

Remarque : les réglages peuvent varier en fonction des différents instruments et logiciels. En général la méthode suivante est applicable : paramétrer le logiciel du lecteur pour collecter les données en mode $V_{moyenne}$. Vérifier les réglages corrects dans le manuel du logiciel pour s'assurer que la valeur calculée est le taux moyen de variation de densité optique pour tous les points de données recueillis. Définir l'intervalle entre les « lectures » de l'instrument au minimum autorisé par le logiciel et instrumenter pendant la période de 40 minutes du test. Les paramètres de longueur d'onde du logiciel doivent être de 405 nm moins le bruit de fond à 490 nm. Si une lecture à double longueur d'onde n'est pas disponible, lire à 405 nm. La température d'incubation doit être réglée à 37 °C. L'agitation des plaques doit intervenir pendant 5 à 10 secondes, avant le début de la lecture. Le mode choisi pour la courbe doit être « linéaire/linéaire » ou équivalent. La lecture doit commencer sans délai.

1. Préparation du standard Glucane fourni avec le kit.
   a. Dissoudre un flacon du standard Glucane avec le volume d'EPA stipulé sur le flacon, pour obtenir une solution de 100 pg/ml. Vortexer au moins 30 secondes pour remettre en suspension (solution 1). La solution de Glucane doit être conservée entre 2 et 8 °C puis utilisée dans les 3 jours. Les étapes b à e ci-dessous illustrent un exemple de préparation d'une gamme d'étalonnage.
   b. Préparer 50 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 1 dans un tube sans Glucane (solution 2). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
   c. Préparer 25 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 2 dans un tube sans Glucane (solution 3). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
   d. Préparer 12,5 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 3 dans un tube sans Glucane (solution 4). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
   e. Préparer 6,25 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 4 dans un tube sans Glucane (solution 5). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
2. Préparation de réactif de prétraitement du sérum. Le réactif alcalin de prétraitement du sérum convertit les Glucanes à triple hélice en Glucanes monobrins (16,17) qui sont plus réactifs dans le dosage. Le pH élevé inactive aussi les sérines protéases et les inhibiteurs de sérines protéases dans le sérum qui peuvent donner respectivement un résultat faux positif ou un résultat faux négatif (22).
   a. Préparer le réactif de prétraitement du sérum en combinant des volumes égaux de 0,25 *M* de KOH et 1,2 de *M* KCl et bien agiter. Les volumes recommandés sont jusqu'à 900 µl de chaque réactif, permettant deux préparations. Couvrir les flacons avec du Parafilm pour utilisation avec la seconde plaque. Couvrir le flacon avec du Parafilm en utilisant la face du Parafilm qui adhérait au papier.

      i. Remarque : lors du tracé de la courbe standard, multiplier la concentration des standards par 5 pour que la plage soit de 500 à 31 pg/ml. Saisir les standards dans les paramètres du logiciels comme étant respectivement 500, 250, 125, 62,5 et 31 pg/ml.

Le volume de standard dans le dosage est 25 µl par puits ou cinq fois le volume de l'échantillon de sérum. La plaque de microtitration avec les standards (St), les témoins négatifs (Neg), et 21 inconnus (Uk) étant chacun dosé en double et disposé comme suit :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		St1	St1		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
C		St2	St2		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
D		St3	St3		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
E		St4	St4		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
F		St5	St5		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
G		Neg	Neg		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
H												

Remarque 1 : les puits externes peuvent être utilisés, s'il a été démontré que la performance de ces puits est comparable à celle des puits internes.
Remarque 2 : pour éviter un contamination accidentelle, remettre en place le couvercle de la microplaque après l'ajout des échantillons et des réactifs dans les puits. Retirer le couvercle avant de placer la plaque dans le lecteur pour éviter une interférence optique due à la condensation.

3. Ajout du sérum et du réactif de prétraitement.
   a. Décongeler les échantillons de sérum à température ambiante. Bien vortexer tous les échantillons.
   b. Transférer 5 µl d'échantillon de sérum dans chacun des puits désignés (Uk) au moins en double. Répéter la manipulation pour chaque échantillon de sérum.
   c. Ajouter 20 µl de réactif de prétraitement de sérum à chaque puits contenant du sérum. *Remarque :* les étapes b et c peuvent être conduites dans l'ordre inverse selon la préférence du technicien.
   d. Agiter la plaque pendant 5 à 10 secondes pour mélanger les contenus du puits (la fonction agitation du lecteur de plaque peut être utilisée), puis laisser incuber pendant 10 minutes à 37 °C dans le lecteur de plaque en incubation.
4. Reconstitution du réactif Fungitell. Remarque : cela peut être effectué pendant l'incubation de prétraitement pour des raisons pratiques.
   a. Reconstituer un flacon de réactif Fungitell, en ajoutant 2,8 ml d'EPA, puis 2,8 ml de tampon de reconstitution Pyrosol au moyen d'un pipeteur de 1000 µl. Couvrir le flacon avec du Parafilm en utilisant la face du Parafilm. Agiter doucement le flacon pour dissoudre complètement, ne pas vortexer.
5. Ajout de témoins négatifs et de standards Glucane. À la fin de l'incubation de prétraitement du sérum (étape 3.d), retirer la plaque du lecteur de plaque en incubation et ajouter les standards et les témoins négatifs à la plaque.
   a. Ajouter 25 µl d'EPA aux puits G2 et G3.
   b. Ajouter 25 µl aux 6,25 pg/ml de solution standard 5 aux puits F2 et F3.
   c. Ajouter 25 µl aux 12,5 pg/ml de solution standard 4 aux puits E2 et E3.
   d. Ajouter 25 µl aux 25 pg/ml de solution standard 3 aux puits D2 et D3.
   e. Ajouter 25 µl aux 50 pg/ml de solution standard 2 aux puits C2 et C3.
   f. Ajouter 25 µl aux 100 pg/ml de solution standard 1 aux puits B2 et B3.
6. Ajout du réactif Fungitell et procédure d'incubation de la plaque.
   a. Ajouter 100 µl de réactif Fungitell à chaque puits (contenant témoins négatifs, standards et échantillons) au moyen du pipeteur à répétition.
   b. Introduire la plaque dans le lecteur de microplaque (équilibré à 37 °C) avec le couvercle et remuer pendant 5 à 10 secondes. Lire la plaque sans le couvercle à 405 nm moins 490 nm, pendant 40 minutes à 37 °C. Si la soustraction du bruit de fond (à 490 nm) n'est pas disponible, une lecture à 405 nm est acceptable. En l'absence de fonction d'agitation sur le lecteur de microplaque on peut utiliser un agitateur de microplaque externe.
   c. Collecter les données et les analyser comme suit : examiner les parcelles de densité optique des échantillons à analyser et vérifier les modèles de trace cinétique autres qu'une augmentation homogène comparable à celles des normes. Les parcelles non valides indiquent une interférence optique. Calculer le taux moyen de variation de densité optique (unités de milli-absorbance par minute) pour tous les points entre 0 et 40 minutes.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de tests Fungitell doivent être utilisés comme aide au diagnostic d'une infection fongique. Les résultats sont exprimés en pg/ml de sérum et vont du non détectable (<31 pg/ml) à >500 pg/ml et sont imprimés par le logiciel ou lus sur la courbe standard. Les valeurs précises supérieures à 500 pg/ml nécessitent une dilution de l'échantillon dans de l'EPA et un nouveau test.

Le laboratoire réalisant le test doit informer le médecin prescripteur que le test Fungitell ne détecte pas certaines espèces fongiques comme l'espèce *Cryptococcus* (3,4) qui produit de très faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane. Le dosage ne détecte pas les zygomycètes comme *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus* (1,4) qui ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-Glucane. De même, *Blastomyces dermatitidis,* en phase de levure, produit peu de (1→3)-β-D-Glucane, et est généralement indétectable (5).

RÉSULTAT NÉGATIF
Des valeurs de (1→3)-β-D-Glucane < 60 pg/ml sont interprétées comme étant des résultats négatifs.

RÉSULTAT POSITIF
Des valeurs ≥ 80 pg/ml sont interprétées comme étant positives. Un résultat positif signfie que du (1->3)-β-D-Glucane a été détecté. Un résultat positif n'indique pas la présence d'une maladie et ne doit pas être associé aux autres signes cliniques pour établir un diagnostic.

RÉSULTAT INDÉTERMINÉS
Des valeurs comprises entre 60 et 79 pg/ml suggèrent une possible infection fongique. Des prélèvements et tests de sérum supplémentaires sont recommandés. Les prélèvements et tests fréquents améliorent l'utilité du diagnostic.

CONTRÔLE DE QUALITÉ
- Le coefficient de corrélation (r) de la courbe standard (linéaire contre linéaire) doit être > 0,980.
- Les puits (25 µl d'EPA) sont des témoins négatifs. Les témoins négatifs doivent avoir des valeurs de taux de densité optique réelle ($V_{moyenne}$) inférieures de 50 % au standard le plus faible. Dans le cas contraire, le dosage doit être répété avec de nouveaux réactifs.
- Gestion des échantillons à problème. Si le biologiste observe des cinétiques de densité optique inhabituelle dans un test d'échantillon qui sont floconneux, décolorés ou troubles (tels ceux grossièrement hémolysés, lipémiques ou contenant trop de bilirubine), l'échantillon doit être dilué dans de l'EPA et retesté. La dilution doit être prise en compte dans la mention du résultat en multipliant le résultat par le facteur de dilution. Généralement, le facteur de dilution est saisi dans la configuration du logiciel pour l'échantillon et la correction est appliquée automatiquement.
- Les échantillons témoins à des niveaux limites et hautement positifs, doivent être analysés pour vérifier que les réactifs et le dosage fonctionnent correctement. Chaque utilisateur du test doit établir un programme de contrôle qualité pour assurer la qualification dans les réalisations du test.

LIMITES DU TEST
1. La localisation dans les tissus de l'infection fongique (10), l'encapsulation et la quantité de (1→3)-β-D-Glucane produite par certains champignons peuvent affecter la concentration sérique de cet analyte. La capacité réduite de contribution du (1→3)-β-D-Glucane au flux sanguin peut réduire la capacité de détecter certaines infections fongiques. *Cryptococcus spp*. produit de faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane (3,4). Les zygomycètes, dont *Absidia ssp.*, *Mucor spp*. et *Rhizopus spp*., ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-Glucane (1,4). *Blastomyces dermatitidis* en phase de levure, produit peu de (1→3)-β-D-Glucane, et les résultats du test sont généralement négatifs (5).
2. Certains individus ont des taux élevés de (1→3)-β-D-Glucane qui tombent dans la zone indéterminée. Dans de tels cas, des tests supplémentaires sont recommandés.
3. La fréquence des tests patients dépend du risque relatif d'infection fongique. Des fréquences de prélèvements d'au moins deux à trois fois par semaine sont recommandées pour les patients à risque.
4. Des résultats positifs ont été observés chez des patients en hémodialyse (18,19), des sujets traités avec certains produits sanguins fractionnés comme l'albumine sérique et les immunoglobulines (23) et chez les spécimens ou sujets exposés à des gazes contenant du glucane. Les patients nécessitent 3 à 4 jours pour la restauration des taux initiaux de (1→3)-β-D-Glucane après une exposition chirurgicale à des éponges et gazes contenant du (1→3)-β-D-Glucane (20,21). En conséquence la chronologie des prélèvements chez des patients chirurgicaux doit prendre cet aspect en compte.
5. Les échantillons obtenus par des méthodes de ponction au talon ou au doigt ne sont pas acceptables car le tampon alcoolisé pour préparer le site (et, potentiellement, la surface cutanée de prise de sang) s'est avéré contaminer les spécimens.
6. Les taux de (1→3)-β-D-Glucane ont été établis chez des sujets adultes. Les taux normaux chez le nourrisson et l'enfant approchent ceux des adultes (24). On ne dispose pas de données pour les nouveaux-nés et les nourrissons de moins de 6 mois.
7. La zone de mesure est de 31 pg/ml à 500 pg/ml. Les valeurs < 31 pg/ml doivent être mentionnées comme étant < 31 pg/ml. Les valeurs > 500 pg/ml doivent être mentionnées comme étant > 500 pg/ml, sauf si l'échantillon a été dilué.

SUSBSTANCES CRÉANT DES INTERFÉRENCES
Les conditions suivantes des échantillons peuvent créer une interférence avec un résultat précis de dosage Fungitell :
- Hémolyse
- Turbidité de l'échantillon provoquée par une lipémie
- Présence visible de bilirubine
- Sérum trouble

RÉSULTATS ATTENDUS
Les valeurs de bêta-Glucane sont élevées dans différentes infections fongiques. Quand des signes et symptômes sont présents à des taux de 80 pg/ml ou plus, la valeur prédictive positive du test pour une infection fongique est comprise entre 74,4 et 91,7 % (Tableau 2). En l'absence de signes et symptômes à moins de 60 pg/ml, les valeurs prédictives négatives sont comprises entre 65,1 % et 85,1 %.

PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES
Test de comparaison
Une étude prospective multicentrique a été conduite pour valider les performances du dosage Fungitell (25). Le test a été comparé à d'autres méthodes standard de détection (c'est-à-dire, hémoculture biopsique et examen radiologiques) pour détecter des mycoses et fongémies.

Trois cent cinquante neuf (359) patients ont été testés avec le dosage. Un échantillon unique a été obtenu de chaque patient. Les sujets à faible risque ont inclus des individus apparemment sains et des patients de sites cliniques hospitalisés pour des raisons autres que des infections fongiques. Le recrutement des sujets a été conduit dans six centres médicaux des États-Unis. Quatre de ces centres ont réalisé le dosage et testé un total de 285 échantillons. ACC a testé l'ensemble des 359 échantillons deux fois, mais n'a utilisé que le second jeu de résultats pour établir les performances du dosage. Les résultats de deuxième jeu d'analyses n'ont pas été statistiquement différents de ceux du premier jeu.

La sensibilité de l'ensemble de la population des sujets (359) y compris *Cryptococcus* a été de 65,0 % (intervalle de confiance (I.C.) de 60,1 à 70,0 %). La spécificité a été de 81,1 % (I.C. de 77,1 % à 85,2 %) (Tableau 1). Les résultats des tests obtenus dans les quatre centres ont ont montré une plage de sensibilité de 50,0 % à 66,7 %. La spécificité a été comprise entre 70,0 % et 93,0 % sur les 285 échantillons testés (Tableau 2).

Tableau 1 Résultats des tests réalisés par ACC pour des valeurs seuil de 60-80 pg/ml par site

Site	Prouvé/Probable **Sensibilité** >= 80 pg/ml			**Spécificité** < 60 pg/ml			Équivoque 60 <= X < 80	Total
	Pos/Clin. Pos	**Sensibilité**	Valeur prédictive positive	Nég/Clin. Nég	**Spécificité**	Valeur prédictive négative		
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	S/O	0/0	S/O	0,0	0	1
Total*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

***inclut un échantillon du Site 6.**
Lorsque les résultats obtenus par ACC (359 échantillons) et par les centres médicaux (285 échantillons) sont comparés au diagnostic clinique, la sensibilité est de 64,3 % (IC de 58,8 % à 69,9 %) pour ACC et de 61,5 % (IC de 55,9 % à 67,2 %) pour les centres médicaux. La spécificité est de 86,6 % (IC de 82,7 % à 90,6 %) pour ACC et de 79,6 % (IC de 74,9 % à 84,3 %) pour les centres médicaux (Tableau 2).

Tableau 2 Résultats des tests réalisés par les centres médicaux pour des valeurs seuil de 60-80 pg/ml par site

Site	Prouvé/Probable **Sensibilité** >= 80 pg/ml			**Spécificité** < 60 pg/ml			Équivoque 60 <= X < 80	Total
	Pos/Clin. Pos	**Sensibilité**	Valeur prédictive positive	Nég/Clin. Nég	**Spécificité**	Valeur prédictive négative		
1	32/50	64,0	74,4	28/40	70,0	65,1	4	90
2	12/24	50,0	75,0	15/20	75,0	65,2	5	44
3 *								
4	22/33	66,7	91,7	40/43	93,0	85,1	5	76
5	22/36	61,1	78,6	30/39	76,9	75,0	7	75
6 *								
Total, Sites	88/143	61,5	79,3	113/142	79,6	73,9	21	285
ACC	92/143	64,3	91,1	123/142	86,6	74,1	18	285

*** Centre n'ayant pas réalisé de test**

CANDIDOSE
Il y avait 107 sujets présentant un diagnostic positif de candidose dans l'étude prospective. Quatre-vingt-trois sur 107 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

Une sérothèque de cent soixante quinze échantillons a été fournie à Associates of Cape Cod. Cent quarante cinq sur 175 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

ASPERGILOSE
Un total de 10 sujets présentait une aspergillose. Huit sur 10 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

FUSARIOSE
Trois sujets présentaient une fusariose. Deux sur 3 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

TRAITEMENT MÉDICAMENTEUX ANTI-FONGIQUE
La présence ou l'absence d'un traitement médicamenteux anti-fongique n'a pas eu d'effet statistiquement significatif sur la sensibilité du dosage. Cent dix-huit sujets sous traitement anti-fongique ont été prouvés positifs pour une infection fongique. Quatre-vingt-deux ont été positifs au dosage (sensibilité, 69,5 % ; IC de 61,2 % à 77,8 %). En outre, vingt-quatre (24) sujets ont été positifs, mais pas sous traitement anti-fongique. Dix-huit ont été positifs au dosage (sensibilité, 75 % ; IC de 57,7 % à 92,3 %).

SPÉCIFICITÉ
Au total, 170 sujets ont été retrouvés négatifs pour l'infection fongique et étaient des individus apparemment sains. La spécificité a été de 86,5 % avec le dosage (I.C de 82.8 % à 90,1 %). Lorsque les 26 sujets supplémentaires qui étaient négatifs pour l'infection fongique mais présentant d'autres troubles ont été inclus, une spécificité de 81,1 % a été observée (I.C. de 77,1 à 85,2 %).

CORRÉLATIONS DES TESTS
Quatre des centres médicaux ont dosé un total de 285 échantillons. Les résultats des tests des centres médicaux sont corrélés à 96,4 % avec les résultats des Associates of Cape Cod. Les corrélations entre les résultats retrouvés par Associates of Cape Cod et ceux retrouvés par les centres médicaux sont comprises entre 90,6 et 99,2 %.

EXACTITUDE
Dans les études d'exactitude, dix (10) échantillons différents ont chacun été testés par trois centres médicaux sur trois jours différents. La variation intra-dosage a été comprise entre 0,9 et 28,9 %. La variation inter-dosage a été comprise entre 3,9 et 23,8%. Les quatre (4) échantillons négatifs ont été exclus de ces deux analyses.

RÉFÉRENCES

1. Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. Medical Mycology 44: 267-272.
2. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Concensus Group. Clin. Inf. Dis. 46: 1813-1821.
3. Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K-I., Ishikawa, N., and Hara, K. 1995. Plasma (1→3)-ß-D-Glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. J. Clinical Microbiol. 33: 3115-3118.
4. Mitsuya, M., Wada, K. and Yamaguchi, H. 1994. In vitro studies on the release of G Test-positive (1→3)-ß-D-Glucans from various fungal pathogens. In Committee on Organic Dusts, ICOH, Report 1/94, Rylander, R. and Goto, H. editors. pp 29-37.
5. Girouard, G., Lachance, C., and Pelletier, R. 2007. Observations of (1→3)-ß-D-Glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. J. Med. Mycology 56: 1001-1002.
6. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999: 1:247-261.
7. Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New England Journal of Medicine. 1998: 338:1741-1751.
8. Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H. Yasuoka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-ß-D-Glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 345: 17-20.
9. Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Micro. Rev. 9: 499-511.
10. Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl.Infectious Dis. 2002: 4 (Suppl. 3):32-37
11. Lass-Florl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.
12. Nucci, M. and Anaissie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.
13. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2004. ß-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199-205.
14. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.
15. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (13)-ß-D-Glucans. Carbohydrate Res. 218:167-174.
16. Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-ß-D-Glucans in the activation of coagulation factor G from *Limulus* amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.
17. Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and Saito, H. 1993. Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-ß-D-Glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.
18. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-ß-D-Glucan level. Kidney International 60: 319-323.
19. Kato, A., Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-ß-D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
20. Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-ß-D-Glucan derived from different gauze types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.
21. Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of ß-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
22. Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T, and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-ß-D-Glucan in human blood. Clin. Chim. Acta 226: 109-112.
23. Ogawa, M., Hori, H., Niiguchi, S., Azuma, E., and Komada, Y. 2004. False positive plasma (1→3)-ß-D-Glucan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. Int. J. Hematol. 80: 97-98.
24. Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., and Steinbach, W.J. 2007. (1→3)-ß-D-Glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-glucan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924-925.
25. Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)-ß-D-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin. Inf. Dis. 41: 299-305.

RÉFÉRENCES SUPPLÉMENTAIRES NON CITÉES

a) Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeken, E., De Munter, P., Meersseman, W., Van Meensel, B., Van Eldere, J., Lagrou K. 2009. Serum (1→3)-ß-D-Glucan as a diagnostic tool for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection or hematological malignancy. J. Clin. Microbiol. 47: 3871-3874.
b) Koo, S., Bryar. J.M., Page. J.H., Baden. L.R., Marty, F.M. 2009. Diagnostic performance of the (1→3)-ß-D-Glucan assay for invasive fungal disease. Clin. Infect. Dis. 49:1650-9.
c) Ellis, M., Ramadi, B., Finkelman, M., Hedstrom, U., Kristenson, J., Ali-Zadeh, H., and Klingspor, L. 2007. Assessment of the clinical utility of serial ß-D-Glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. J. Med. Microbiol. 57: 287-95.
d) Marty, F.M., Lowry, C.M., Lempitski, S.J., Kubiak, D.W., Finkelman, M.A., and Baden, L. R., 2006. Reactivity of (1→3)-ß-D-Glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemo. 50: 3450-3453.
e) Marty, F. M., Koo, S., Bryar,and J., and Baden, L.R. 2007. (1→3)-ß-D-Glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jiroveci* pneumonia. Ann. Int. Med. 147: 70-72.
f) Obayashi, T., Yoshida, M., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Kawai, T. 1992. Determination of plasma (1→3)-ß-D-Glucan: A new diagnostic aid to deep mycosis. J. Medical and Vet. Mycol. 30: 275-280.
g) Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T., and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-ß-D-Glucan in human blood. Clinica Chimica Acta 226: 109-112.
h) Yasuoka, A., Tachikawa, N., Shimada, K., Kimura, S., and Oka, S. 1996. (1→3)-ß-D-Glucan as a quantitative serological marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clinical and Diagnostic. Lab. Immuno. 3: 197-199.
i) Yoshida, M., Obayashi, T., Iwama, A., Ito, M., Tsunoda, S., Suzuki, T., Muroi, K. Ohta, M., Sakamoto, S., and Miura, Y. 1997. Detection of plasma (1→3)-ß-D-Glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. J. Med. Vet. Mycology 35:371-374.
j) Yuasa, K., Goto, H., Iguchi, M., Okamura, T., and Ieki, R. 1996. Evaluation of the diagnostic value of the measurement of (1→3)-ß-D-Glucan in patients with pulmonary aspergillosis. Respiration 63: 78-83.

LÉGENDE DES SYMBOLES
	« À utiliser avant »
Σ N	**« Contenu suffisant pour <n> tests »**
LOT	**« Code du lot »**
IVD	**« Dispositif médical pour diagnostic in vitro »**
REF	**« Référence n° »**
	« Limite de température »
	« Fabricant »
	« Voir mode d'emploi »
EC REP	**« Représentant agréé »**
CE	**« Marque CE »**

EC REP **Associates of Cape Cod International, Inc.**
Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, UK